

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(54) REAGENT FOR MEASURING COMPLEMENT VALUE

(11) 62-299764 (A) (43) 26.12.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-142705 (22) 20.6.1986
 (71) TOSHIBA CORP (72) MASAKO HADO(3)
 (51) Int. Cl. G01N33/544

PURPOSE: To improve measurement sensitivity over a wide range by constituting the titled reagent of at least either of phospholipid or glycolipid or pyridyl-contg. chemical material and sealing a hydrophilic labeling material into liposome.

CONSTITUTION: The liposome used for the reagent for measuring complement value is constituted of at least either of the phospholipid or glycolipid or the pyridyl group-contg. chemical material such as nicotinic acid. The constituting ratio range of said materials is preferably 80~120:1~0.1mol% phospholipid or glycolipid:pyridyl group-contg. chemical material and further, cholesterol is incorporated at about 80~120mol% thereon per 80~120mol% phospholipid or glycolipid. The labeling material to be sealed into the liposome is preferably a material which is hydrophilic and can be quantitatively determined when eluted to the outside of the liposome, for example, fluorescent material such as calcine. The complement value of a sample can be determined by measuring the outflow rate of the labeling material.

(54) MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD FOR MEASURING PSEUDOLYSINE ϕ USING SAID ANTIBODY

(11) 62-299765 (A) (43) 26.12.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-143484 (22) 19.6.1986
 (71) SENDAI BISEIBUTSU KENKYUSHO (72) KUNIHIKO ITO(3)
 (51) Int. Cl. G01N33/574, G01N33/577//C07K15/04, C12N5/00, C12N15/00, C12P21/00(C12P21/00, C12R1:91)

PURPOSE: To easily and quickly discriminate the presence or absence of a progressive cancer or not by adding a monoclonal antibody to pseudolysine ϕ to a specimen and measuring the generated composite pseudolysine ϕ -monoclonal antibody material.

CONSTITUTION: An animal is immunized by using the pseudolysine ϕ and the spleen cells of the animal are sampled. The pseudolysine ϕ is conjugated to a carrier protein of bovine serum albumin, etc., and is then used as an immune source. The resultant spleen cells are made confluent with the myeloma cells to obtain a hybridoma. The pseudolysine ϕ is measured by using the monoclonal antibody produced from the resultant hybridoma, by which the presence or absence of the progressive cancer is easily and quickly discriminated.

(54) MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD FOR MEASURING 1-METHYL ADENOSINE USING SAID ANTIBODY

(11) 62-299766 (A) (43) 26.12.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-143483 (22) 19.6.1986
 (71) SENDAI BISEIBUTSU KENKYUSHO (72) KUNIHIKO ITO(3)
 (51) Int. Cl. G01N33/577

PURPOSE: To make the easy and quick discrimination of the presence or absence of a progressive cancer by adding a monoclonal antibody to 1-methyl adenosine to a specimen and measuring the generated 1-methyl adenosine-monoclonal antibody complex.

CONSTITUTION: An animal is immunized by using the 1-methyl adenosine and the spleen cells of the animal are sampled. The 1-methyl adenosine alone cannot be an immune source in this stage; therefore, a carrier protein such as bovine serum albumin is conjugated thereto and the conjugate is used as the immune body. The spleen cells of the resulted immune animal are fused with the myeloma cells to obtain a hybridoma. The 1-methyl adenosine is measured by using the monoclonal antibody produced from the resulted hybridoma, by which the presence or absence of the progressive cancer is easily and quickly discriminated.

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭62-299765

⑤ Int. Cl. *	識別記号	厅内整理番号	⑬ 公開 昭和62年(1987)12月26日
G 01 N 33/574		Z-7906-2G	
33/577		7906-2G	
// C 07 K 15/04		8318-4H	
C 12 N 5/00		7115-4B	
15/00		7115-4B	
C 12 P 21/00		6712-4B	
(C 12 P 21/00)			
C 12 R 1:91)			

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 単クローニ性抗体及びこれを用いるシードウリジンの測定法

⑮ 特 願 昭61-143484

⑯ 出 願 昭61(1986)6月19日

⑰ 発明者 伊藤 邦彦 仙台市郡山字源兵衛西13-4
 ⑰ 発明者 馬島 敏郎 仙台市八幡1-6-22 佐重ハイツ402号
 ⑰ 発明者 石田 名香雄 仙台市角五郎1-5-40
 ⑰ 発明者 水柿 道直 仙台市国見1-7-33
 ⑰ 出願人 財団法人 仙台微生物 研究所 仙台市葉山町5番12号
 ⑰ 代理人 弁理士 有賀 三幸 外2名

明細書

1. 発明の名称

単クローニ性抗体及びこれを用いるシードウリジンの測定法

2. 特許請求の範囲

1. シードウリジンに対する単クローニ性抗体。

2. 次の性質、

(1) 抗体のクラス: IgG,

(2) 抗体価: 8~16倍

(3) 交差反応性:

(i) ウリジン 95~99%

(ii) ウラシル 30~40%

を有する特許請求の範囲第1項記載の単クローニ性抗体。

3. 被検体にシードウリジンに対する単クローニ性抗体を加え、生じたシードウリジン-単クローニ性抗体複合物量を測定することを特徴とするシードウリジンの測定法。

3. 発明の詳細を説明

(産業上の利用分野)

本発明は単クローニ性抗体に関し、更に詳細には進行癌のマーカーであるシードウリジン (*puoridine* φ) に対する単クローニ性抗体に関する。

(従来の技術及びその問題点)

近年癌関連抗原に対する単クローニ性抗体を用いた臨床検査診断が盛んに実施されている。また、癌になると増加することが知

られている物質である癌胎児性抗原 (CEA)、 α -フェトプロテインなどに対する抗体を用いて同様なことが行われている。

ところで、癌になると増加する物質、すなわち癌マーカーと呼ばれている物質の中で、進行癌患者尿中に増加するものとしてシュードウクリジン α が知られている。この物質はトランスクアード・リボヌクレオツクアシド (t-RNA) の構成成分の一つであり、その増加の原因は、癌組織における t-RNA のブレークダウン (breakdown) が正常組織に比較し、亢進しているためであるといわれているが、その増加のメカニズムの詳細については未解明である。

現在、このシュードウクリジン α （以下

「 α 」と略称することがある）の量を測定し、これから進行癌の存在を判定する試みがなされているが、 α の定量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でおこなわれるため、サンプルの前処理等が煩雑であり、多検体を測定するには非常に長時間を要するという欠点があつた。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、簡便な α の測定法を開発すべく、種々検討をおこなつた結果、 α に対する单クローニ性抗体を新たに作成し、これを用いることにより、尿サンプルの前処理操作を行うことなく ELISA 法を応用した多検体同時測定方法を実施することができ、測定の迅速化、簡素化がはかれることを見出した。

したがつて、本発明は、進行癌のマーカーである α に対する单クローニ性抗体及びこれを用いる α の測定方法を提供するものである。

本発明の α に対する单クローニ性抗体は、例えば次の如くして調製される。

すなわち、まず、 α を用いて動物を免疫し、その動物の脾細胞を採取する。この工程において、 α はそれ単独では免疫原となり得ないので、適当なキャリア・プロテイン (Carrier Protein) と結合させたのち、免疫原として用いる。 α としては、例えば進行癌患者の尿中から公知の方法、例えばシグマ (Sigma) 社から販売されている標品を用いることができ、キャリア・プロテインとしては、ハプテン部分を免疫担当細胞が認識することを可能

にする目的で用いられるプロテイン、例えばキーホール・リンペクト・ヘモシアニン、牛血清アルブミン等を用いることができる。また、この α とキャリア・プロテインを結合する方法としては、例えば、核酸塩基の糖部分を過ヨウ素酸で酸化したのちにキャリア・プロテインと結合させる等の方法が挙げられる。更に、免疫動物としては、マウス、ラット等が挙げられる。

次に得られた免疫動物の脾細胞を骨髓腫細胞と融合し、ハイブリドーマを得る。細胞融合においては、公知のポリエチレングリコールを用いる方法及びウイルスを用いる方法のいずれを用いても良いが、ハイブリドーマのスクリーニングに当つては、キャリア・プロ

テインに対する抗体産生ハイブリドーマを除去するための留意が必要である。このためには、免疫に用いたキャリア・プロテインと異なつた理由でのプロテインとゆを結合させたものを抗原としてスクリーニングする等の方法を用いることが望ましい。

斯くして得られるハイブリドーマから産生される、本発明の単クローン性抗体は、次に示す如き性質を有する。

(1) 抗体のクラス： IgG₁

(2) 抗体価： 8～16倍

(3) 交差反応性：

(i) ウリジン 95～99%

(ii) ツラシル 30～40%

以上のようにして得られた単クローン性抗体

を用いてゆを測定する場合の例を挙げれば次の通りである。

すなわち、96ウェルプレートに、ゆと牛血清アルブミン(BSA)の結合物を2μl/穴で添加したのち、4℃で、12～24hr放置する。次に各ウェルに1% BSA を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を100μlずつ添加することにより、抗体その他のタンパクの非特異的吸着を防止する。次に試料(尿など)を各ウェルに50μl添加し、さらに、本発明の単クローン性抗体(20倍希釈液)を各ウェルに50μl添加する。よくかくはんしたのちに、4℃で1時間放置する。反応混合物をPBSでよく洗浄したのちに、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体

の1000倍希釈液を各ウェルに100μlずつ添加する。室温で30分間反応させたのちに、PBSでよく洗い、水分を切つたのちに基質溶液(パラニトロフェニルオストフェート1mg/ml, pH 9.8ジエタノールアミンバツフラー)を100μlずつ加え、37℃で30分間反応させる。各ウェルの405nmにおける吸光度をEIAリーダーで測定することにより試料中に存在するゆ量の定量を行なう。

〔本発明の効果〕

以上のように本発明の単クローン性抗体を用いれば、試料の前処理をおこなうことなくゆの測定をおこなうことができ、しかもHPLCの如き大がかりな装置も必要としないので、

簡便かつ迅速に進行癌の有無を判定することができる。

〔実施例〕

次に実施例を挙げ、本発明を説明する。

実施例1

(1) 免疫原の調製：

癌患者の尿中から常法により分離したゆと、キャリアプロテインであるキーホール・リンベット・ヘモシアニン(Keyhole limpet hemocyanine ; KLH)をエルランガー(Erlanger)とビーザー(Bieser)の方法(過ヨウ素酸酸化法)により結合した。すなわちゆを過ヨウ素酸で酸化し、過剰の過ヨウ素酸をエチレングリコールで分解したのち、アルカリ性(pH 9～9.5)条件下でKLHと

結合させ、シップ塩基を形成させる。ついで NaBH_4 で還元し、安定化合物を生成させる。この反応混合物を緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4）中で一晩透析し、未反応のものを除き、このあと凍結乾燥に付し -20°C の冷凍庫中に保存した。

(2) 単クローニ性抗体の作成：

(II) (II)で得たゆと KLH 結合物を、フロイントの完全アジュバント (Freund's Complete Adjuvant) と等量混合し、エマルジョンとしたのち、BALB/cマウスの腹腔内に一匹当たり 50 μ g 投与した。2回目以降は不完全アジュバント (Incomplete adjuvant) を用いたエマルジョンを、10日間隔で2回腹腔内に投与した。最終免疫はゆ - KLH 100 μ g

により行つた。この方法により最も優れた
キャリアプロテインに対する抗体を產生す
るハイブリドーマの除外に成功した。次にウ
による阻害がかかるか否かを検討することに
よりウと特異的に反応する単クローニ性抗体
を產生するハイブリドーマを選択した。ここ
で選択された細胞株に限界希釈法によりクロ
ーン化し単クローニ性抗体產生ハイブリドー
マクローニを樹立した。

(3) 単クローニン性抗体の性質:

中に対する単クローニング抗体は2種得られ
抗体のクラスはいずれもIgG₁であつた。抗
体価は8~16倍(培養上清を2段階希釈し、
それぞれと中-BBAを反応させるELISA
を行つた時、最も高い吸光度の持続する希釈

1% 溶液を 0.2 ml 静脈内投与した。

(ii) 最終免疫の3日後に、過免疫マウスから摘出した脾細胞と BALB/c マウス由来ミエローマ細胞株・P 2 / 0 - A₂ 14 をポリエチレングリコール (PEG) 4 0 0 0 を用いて融合した。細胞は 9 6 穴プレートに 1 0 0 μ l / 穴ずつ加え、24時間後に培地の半量をハット (HAT) 培地に交換し 2 日おきに培地交換した。7 ~ 10 日後に HAT 耐性のハイブリドーマの成長がみられてくる。この時期に培地を HT に変え、約 10 日間培養したのちにハイブリドーマ生育培地に変えた。

(問) 抗体産生細胞のスクリーニングは、と牛
血清アルブミン (BSA) を結合させたものを
抗原として用いた抗体エライザ (ELISA) 法

倍率を抗体価とした) であつた。

また、種々のプリン、ピリミジン修飾、非修飾スクレオンドおよび塩基類との交差反応性を検討したところウリシンに 95~99%、ウラシルに 30~40% の交差反応性を示したが、他の化合物とは交差反応は示さなかつた。その結果から、この抗体の認識するエピトープはゆの塩基部分であると判断された。

实施例 2

中の 1.0, 5, 2.5, 1.25, 0.63 μg
 / 稀釀液を、あらかじめ 9-BSA 0.2 μg /
 穴でコートされた 9.6 穴プレートへ 50 μL
 ずつ加え。実施例 1 で得られた单クローン性
 抗体の 20 倍希釀液を 50 μL ずつ加え、競
 合阻害試験を行つた。この結果、第 1 図に示

すように遊離の中の用量に依存して抗体と γ -BSA の結合が阻害されることが明らかとなつた。

実施例 3

実施例 2 の中溶液に代えて試料として正常人及び癌患者の尿を用い、同様に競合阻害試験をおこなつた。実施例 2 の結果から得た検量線を用い、試料中の γ 量を測定した。この結果を下表に示す。

試料番号*	シードウリシンの量 (nmol / μ mol creatinine)	
1	742±00	(1.00)**
2	1037.2±55.4	(1.40)
3	1854.4±218.6	(2.50)
4	922.8±54.6	(1.24)
5	1242.0±14.1	(1.67)
6	1421.7±51.4	(1.92)
7	1147.4±38.3	(1.55)
8	600.8±12.1	(0.81)
9	749.5±163.9	(1.01)

* 各試料は次の通りである。

1 正常人尿

2 癌患者尿 (肝臓癌、肺転移)

3 * (原発性肝癌)

4 * (胆管細胞癌)

5 * (胃癌)

6 * (原発性肝癌)
 7 * (急性骨髄性白血病)
 8 } 正常人尿
 9 }

** カッコ内は、正常人尿中の γ 量に対する各試料の γ 量の比を示すものである。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、 γ の用量と 405 nm の吸光度の関係を示す図面である。

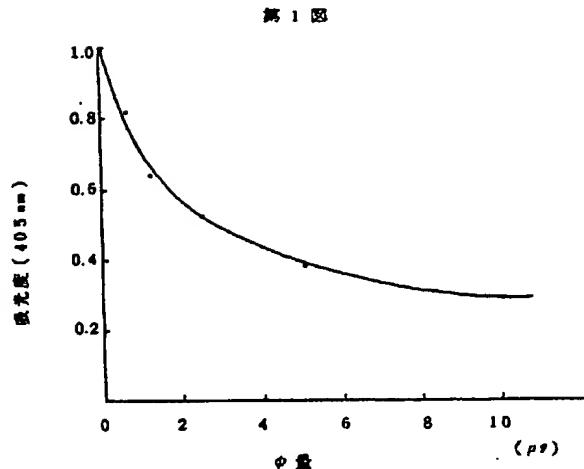
以上

出願人 財団法人 仙台微生物研究所

代理人 弁理士 有賀 三幸

弁理士 高野 登志雄

弁理士 小野 信夫



手 続 補 正 書(自発)

昭和61年7月3日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示 61-143484

昭和61年6月19日提出の特許願(2)

2. 発明の名称

单クローン性抗体及びそれを用いるシユードクリシングの測定法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 財團法人 仙台微生物研究所

4. 代理人

住 所 京都府中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)

共同ビル 電話(669)090480

氏 名 (6870)弁理士 有賀 三幸

住 所 同 上

氏 名 (7756)弁理士 高野 登志雄

住 所 同 上

氏 名 (8632)弁理士 小野 信夫

5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書中、第8頁、第4行ないし第5行
「2 μl/穴」とあるを
「0.2 μl/穴」と訂正する。

(2) 同第13頁、第7行

「細胞株に」とあるを
「細胞株を」と訂正する。